cobas®

この添付文書をよく読んでから使用してください。
また、必要時に読めるように保管しておいてください。

体外診断用医薬品　　**2015 年　1 月改訂（第 3 版）
*2015 年　1 月改訂（第 2 版）

製造販売承認番号:22600AMX01329000

BRAF 遺伝子変異検出キット

# コバス® BRAF V600 変異検出キット

## 【全般的な注意】

1. 本検査の対象者に、検査の目的・方法及び精度、特に不可避な偽陽性・偽陰性を含む診断限界などについて正確な情報を伝えてください。
2. 本品は体外診断用であり、ベムラフェニブ投与前の悪性黒色腫の検査以外の目的には使用しないでください。
3. 添付文書に記載された使用目的及び用法・用量に従って使用してください。記載された使用目的及び用法・用量以外での使用については、測定結果の信頼性を保証しかねます。
4. 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読み、記載に従って使用してください。
5. 本品は、検査に用いられた DNA の5%以上に BRAF V600E 遺伝子変異が含まれる場合に陽性と判定されるように設計された診断薬であり、性能には限界があります。＊本数値は、悪性黒色腫患者由来 FFPE 組織検体及び悪性黒色腫細胞株より抽出した DNA を用いて検証された数値です。
   また、本品は、BRAF V600K 及び V600D 変異に対しても交差反応性を示します（【性能】の項、「2.最小検出感度」(2)を参照）。
6. 変異陽性と判定された場合でも偽陽性の可能性を考慮し、ベムラフェニブ投与に際し、判定結果とその限界及び偽陽性だった場合に考えられる不利益についてじゅうぶんに説明してください。

## 【形状・構造等（キットの構成）】

コバス BRAF V600 変異検出キット

1. コバス BRAF V600 変異検出キット リアクションミックス
   〔RXNMIX〕　3×0.16 mL
   2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸（dATP）
   2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸（dCTP）
   2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸（dGTP）
   2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸（dUTP）
   2'-デオキシチミジン-5'-三リン酸（dTTP）
   Z05 DNA ポリメラーゼ
2. コバス BRAF V600 変異検出キット オリゴミックス
   〔BRAF OM〕　3×0.13 mL
   プライマー-TTS068-BRAF_F1
   プライマー-RL_BRAF_R5
   蛍光標識 DNA プローブ-RAL_BRAF_MU23
3. コバス BRAF V600 変異検出キット 酢酸マグネシウム試薬
   〔MGAC〕　3×0.15 mL
   酢酸マグネシウム
4. コバス BRAF V600 変異検出キット MUTコントロール
   〔BRAF MUT〕　2×0.13 mL
5. コバス BRAF V600 変異検出キット WTコントロール
   〔BRAF WT〕　2×0.13 mL
6. コバス BRAF V600 変異検出キット 希釈液
   〔DNA SD〕　2×1 mL
   トリスバッファー

## 【使用目的】

癌組織から抽出したゲノム DNA 中の BRAF 遺伝子変異（V600E）の検出（ベムラフェニブの悪性黒色腫患者への適応を判定するための補助に用いる）

## 【測定原理】

本キットはリアルタイム PCR 法を用いて生体由来のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織から抽出したゲノム DNA 中の BRAF 遺伝子（BRAF V600E）変異を検出します。
BRAF 遺伝子変異検出は次の2つの主なプロセスに基づきます。

1. FFPE 組織からゲノム DNA の抽出。
2. プライマー及び蛍光標識したオリゴヌクレオチド・プローブを使用したターゲット DNA の PCR 増幅及び検出。

一方のプローブは野生型、もう一方のプローブは変異型を検出するよう設計されています。

## 【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取法
   ・HE 染色した標本を作製し、腫瘍細胞が標本にじゅうぶんに含まれていることを確認してください。腫瘍の比率が 50%以下の場合は、マクロダイセクションを行い、腫瘍比率を高めた後 DNA 抽出を行う必要があります。
   ・本キットの測定検体には悪性黒色腫の FFPE 組織から抽出したゲノム DNA を用いてください。強酸を使用した脱灰操作は、強酸が組織中の核酸を分解し、測定に影響を与える可能性がありますので、測定検体として用いないでください。
   ・抽出にはコバス DNA プレパレーションキット（FFPE）（別売品）をご使用ください。
   ・マスターミックスへの検体 DNA のコンタミネーションを防止するために、増幅と検出は DNA 抽出とは異なるエリアで行ってください。
   ・増幅と検出するエリアは、マスターミックスの調製を行う前に清潔にしてください。清潔環境を保つには、操作デスク、ラックやピペットなどを 0.5%の次亜塩素酸ナトリウムで拭いたあと、70%エタノールで拭いてください。
2. 検体の調製法
   ・DNA 抽出操作は、キット内の添付文書に従ってください。
   ・FFPE 組織は、FFPE 作成後 12 ヵ月以内のもの（15～30℃保管）を使用してください。
   ・薄切組織はスライドグラスにマウントしてください。スライドグラスにマウント後は 60 日間安定です。
   ・薄切した切片のうち1枚は、必ず HE 染色を行ってください。染色標本は検鏡を行い、腫瘍細胞範囲をマーキングすることにより、腫瘍細胞と正常細胞のおおまかな面積比率を確認してください。この作業は、腫瘍組織の比率が 50%以下の場合、マクロダイセクションする際に必要になってきます。
   ・DNA 抽出には、5μm に薄切した FFPE 組織で、少なくとも腫瘍組織の比率が 50%以上の切片を用いてください。腫瘍組織の比率が 50%以下の場合は、マクロダイセクションを行い、腫瘍細胞の比率を高めた後 DNA 抽出を行う必要があります。
   ・クロスコンタミネーションにじゅうぶん注意し、エアロゾルの飛散や手袋の汚染などを避ける特別の注意を払ってください。複数の検体を扱う場合でもキャップの開閉は検体ごとに行ってください。また、検体ごとに新しいチップを使用してください。

### （1）コバス DNA プレパレーションキット（FFPE）を用いた核酸抽出

キット内の各試薬は【用法・用量（操作方法）】の項、「2.別途必要な器具・器材・試料等」を参照してください。
また、試薬及び操作の詳細はキット内の添付文書を参照してください。

#### ① コバス DNA プレパレーションキットの各試薬調製

注意）試薬の中に沈殿が認められる場合は、37℃のウォーターバスで溶けるまで温めてください。沈殿がすべて溶けるまで使用しないでください。

PK:　無菌の使い捨て5 mL ピペットを使用して、ヌクレアーゼフリーの滅菌水 4.5 mL を加えて、5～10 回転倒混和をしてください。450μL ずつ、1.5 mL 用滅菌微小遠心管に分注し、必要量以外は-20℃で保管してください。

WBⅠ:ボトルに無水エタノールを 15 mL 加え、ボトルを5～10 回転倒混和します。WBⅠは 15～30℃で 90 日間安定です。

WBⅡ:ボトルに無水エタノールを 50 mL 加え、ボトルを5～10 回転倒混和します。WBⅡは 15～30℃で 90 日間安定です。

#### ② 脱パラフィン操作

(a) 検体数に応じて、50 mL 遠沈管に 40 mL ずつキシレン、エタノールを分注しておきます。
(b) キシレンが 40 mL 入った 50 mL チューブにスライドグラスを入れ、5分間静置します。この 40 mL でスライド2枚まで処理可能です。2枚のスライドをチューブに入れる際は、背合わせに入れます。処理後のキシレンは廃棄します。
(c) エタノールが 40 mL 入った 50 mL チューブにキシレン処理したスライドを入れ、5分間静置します。この 40 mL でスライド2枚まで処理可能です。2枚のスライドをチューブに入れる際は、背合わせに入れます。処理後のエタノールは廃棄します。
(d) スライドグラスを取り出し、5～10 分完全に風乾します。
   この間に、検体識別情報を記載した 1.5 mL 用滅菌微小遠心管を用意し、DNA TLB を 180μL と PK70μL を混和してください（DNA TLB-PK 混合液）。検体が複数の場合は、あらかじめ混合液を作成した後、分注してください。
   1.5 mL 用滅菌微小遠心管は、必ず Safe-Lock microcentrifuge tube を使用してください。
(e) 風乾した組織をカミソリで剥ぎ取ります。その組織を DNA TLB-PK 混合液で湿らせたチップでピックアップし、1.5 mL チューブに入れます。カミソリとチップは、検体ごとに新しいものを使用してください。
   HE 染色から確認された腫瘍組織の比率が 50%以下の場合、腫瘍部分をマクロダイセクションし、腫瘍の含有率を高めてから以下の操作を続けてください。

③ DNA 抽出操作

(a) DNA TLB-PK 混合液をボルテックスで 30 秒間攪拌してください。
(b) 56℃ドライヒートブロックで 60 分間インキュベートします。
(c) インキュベーション後、ボルテックスで 10 秒間攪拌してください。
(d) 90℃ドライヒートブロックで 60 分間インキュベートします。
インキュベーションの間に必要なフィルターチューブを準備します。1検体ごとにフィルターチューブ1本、コレクションチューブ3本、溶出用の 1.5 mL チューブ1本を準備します(1.5 mL のチューブはキットに含まれていません)。
(e) 反応後、チューブをブロックから取り出し、室温に戻します。
(f) スピンダウン後、200μL の DNA Paraffin Binding Buffer を加え3回のピペッティングで均一に混和し、室温で 10 分間放置します。
(g) 100μL のイソプロパノールを加え、3回のピペッティングで混和します。
(h) 全ての反応液(～550μL)をフィルターチューブに移します。
(i) 8,000 g で1分間遠心します。
(j) フィルターチューブを新しいコレクションチューブに移し、古いコレクションチューブは廃棄します。
(k) 500μL の DNA Wash Buffer I をフィルターチューブに加え、8,000 g で1分間遠心します。
(l) コレクションチューブの廃液を捨て、フィルターチューブを再度装着し、500μL の DNA Wash Buffer II をフィルターチューブに加え、8,000 g で1分間遠心します。
(m) フィルターチューブを新しいコレクションチューブに移し、古いコレクションチューブは廃棄します。
(n) 濾過膜を乾かすために 16,000～20,000 g で1分間遠心します。
(o) 100μL の DNA Elution Buffer (DNA EB)をフィルターチューブの中心部に加えます。この時フィルターにチップの先端が触れないように注意します。
(p) 室温で5分間インキュベート後、8,000 g で1分間遠心し、DNA 溶液を 1.5 mL チューブに回収します(抽出 DNA)。

④ DNA 濃度測定と保存

抽出終了後、速やかに濃度測定を行ってください。
(a) 抽出 DNA チューブを5秒間ボルテックス後スピンダウンし、 Nanodrop UV-Vis Spectrophotometer (ND-1000 or ND-2000)と同等品を用いて DNA 濃度を二重測定します。Blank には EB を用います。
(b) 二重測定の結果の平均値を計算します。

注意) 測定値の誤差範囲

測定値の誤差範囲は、平均値が 20 ng/μL 以上の場合、平均値の±10%以内、20 ng/μL 未満の場合は、平均値の±2 ng/μL 以内です。この値から測定値が外れた場合は再度濃度測定を行い、いずれか2点の測定値を用いて、濃度を計算してください。
DNA 濃度が5 ng/μL 未満の場合はスライド枚数を増やして再抽出してください。

ただちに測定を行わない場合は、DNA を保管してください。抽出 DNA は室温(15～30℃)で 24 時間、2～8℃で 14 日間、-15～-25℃で 60 日間安定です。凍結融解は-15～-25℃で保存したとき3回まで可能です。

(2) 抽出 DNA の希釈計算

測定には、1ウェルあたり、125 ng の DNA を使用します。抽出 DNA は5 ng/μL の濃度に希釈して使用します。
抽出 DNA 希釈液を調製するために以下の計算を行います。

① 抽出 DNA 濃度が5 ng/μL から 35 ng/μL までのとき:
(a) 測定に必要な抽出 DNA 量(μL) =
(35μL × 5 ng/μL) ÷ 抽出 DNA 濃度(ng/μL)
(b) DNA SD(DNA 希釈液)の必要量(μL) =
35μL - 測定に必要な抽出 DNA 量(μL)
(例)抽出 DNA 濃度 = 21 ng/μL
抽出 DNA 量(μL) = (35μL × 5 ng/μL) ÷ 21 ng/μL = 8.3μL
DNA SD(μL) = (35μL - 8.3μL) = 26.7μL

② 抽出 DNA 濃度が 35 ng/μL を超えるとき:
DNA 希釈液をすくなくとも 35μL を準備するのに必要な DNA SD の量を計算します。抽出 DNA は、最低5μL を使用します。
(a) 測定に必要な抽出 DNA 量(μL) = 5μL
(b) DNA SD の必要量(μL) =
((5μL × 抽出 DNA 濃度(ng/μL)) ÷ 5 ng/μL) - 5μL
(例)抽出 DNA 濃度 = 42 ng/μL
DNA SD(μL) = ((5μL × 42 ng/μL) ÷ 5 ng/μL) - 5μL = 37μL

(3) 抽出 DNA の希釈

・1.5 mL 用滅菌微小遠心管に希釈計算して得られた DNA SD の必要容量を分注します。
・それぞれの抽出 DNA を5～10 秒間攪拌します。
・チップを毎回取り替えながら計算した量の抽出 DNA を分注します。
・チューブにキャップをして5～10 秒間攪拌します。

3. 妨害物質・妨害薬剤

(1) トリグリセライド 74 mmol/L 以下及びヘモグロビン2 mg/mL 以下での影響は認められませんでした。
(2) 6種類の皮膚関連微生物(表皮ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌、コリネバクテリウム(4種))との交差反応は認められませんでした。

4. 交差反応性

BRAF V600E2 変異について検討を行ったところ、FFPE 組織では変異 DNA が約 68%、プラスミド DNA では 65%以上の時に交差反応が認められました。
BRAF V600K 及び V600D 変異についての検討は、【性能】の項、「2.最小検出感度」(2)を参照してください。
V600R 変異については、交差反応は認められませんでした。D594G、G596R、K601E、L597Q、L597S についても交差反応は認められませんでした。
BRAF 偽遺伝子、ARAF 及び RAF1との交差反応は認められませんでした。

5. その他の留意事項

試料中に PCR の妨害物質が存在すると正しい判定結果が得られないので注意してください。また、試料中に標的 DNA が存在しても最小検出感度以下である場合には陰性と判定されることがありますので注意してください。
FFPE 組織から抽出されたゲノム DNA は長時間のホルマリン固定などにより DNA が断片化されたり二本鎖 DNA がクロスリンクされたりすることで PCR の鋳型として機能しなくなることが報告されています。

## 【用法・用量(操作方法)】

1. 試薬の調製方法及び安定性

RXNMIX、MGAC 及び BRAF OM 以外の各試薬は、室温(15～30℃)に戻してから使用してください。RXNMIX、MGAC 及び BRAF OM は、保存温度2～8℃から直接マスターミックスの調製に使用できます。これらの試薬は開封後使用期限内で4回までの繰り返し使用、又は 60 日間使用できます。
なお、マスターミックス及び BRAF OM は、光感受性であるため、長時間のライトへの暴露は避けてください。

マスターミックスの調製

調製に必要な RXNMIX、BRAF OM 及び MGAC の量は、以下の「ワーキング試薬調製に必要な液量」を参考に調製してください。

必要 RXNMIX 量=(検体数 + 2(BRAF MUT、BRAF WT) + 1) × 10μL
必要 BRAF OM 量=(検体数 + 2(BRAF MUT、BRAF WT) + 1) × 8μL
必要 MGAC 量=(検体数 + 2(BRAF MUT、BRAF WT) + 1) × 7μL
で計算可能です。

ワーキング試薬は調製後1時間以内に、抽出 DNA 希釈液を添加してください。

ワーキング試薬調製に必要な液量(BRAF MUT、BRAF WT＋1を含む)

| | | 検体数 | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 検体数 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| RXNMIX | 10μL | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 |
| BRAF OM | 8μL | 32 | 40 | 48 | 56 | 64 | 72 | 80 | 88 | 96 | 104 |
| MGAC | 7μL | 28 | 35 | 42 | 49 | 56 | 63 | 70 | 77 | 84 | 91 |
| 総量(μL) | | 100 | 125 | 150 | 175 | 200 | 225 | 250 | 275 | 300 | 325 |

2. 別途必要な器具・器材・試料等

(1) DNA 抽出試薬
① コバス DNA プレパレーションキット(FFPE) (別売品)
・DNA Tissue Lysis Buffer (DNA TLB)
・Proteinase K (PK)
・DNA Paraffin Binding Buffer (DNA PBB)
・DNA Wash Buffer I (WB I)
・DNA Wash Buffer II (WB II)
・DNA Elution Buffer (DNA EB)
・Filter tubes with caps (FT)
・Collection Tubes (CT)
② キシレン
③ 無水エタノール
④ イソプロパノール
⑤ ヌクレアーゼフリーの滅菌水
⑥ 5 mL 及び 25 mL 用の使い捨て無菌ピペット
⑦ 1.5 mL 用滅菌微小遠心管(RNase, DNase フリー)
⑧ 37℃恒温槽(必要に応じて)
⑨ 16,000～20,000 回転の高速遠心機
⑩ ボルテックス
⑪ 56℃及び 90℃ドライヒートブロック
⑫ パルス遠心分離機
(2) 遺伝子解析装置 「コバス z 480」及び各専用の備品及び消耗品※1
(3) 滅菌チューブ
(4) マイクロピペット及びチップ(チップは疎水性フィルター付きのもの)
(5) 精製水(ヌクレアーゼフリー)
(6) 1.5 mL 用滅菌微小遠心管(RNase, DNase フリー)
(7) ボルテックス

※1 コバス z 480 用の消耗品を使用してください。

3. 操作方法 (コバス z 480)

【操作上の注意】の項、「2. 検体の調製法」を参考に検体を調製します。その際は、クロスコンタミネーションにじゅうぶん注意してください。
コバス z 480 における操作は機器の取扱説明書に従って操作してください。
(1) コバス z 480 用 AD プレートの測定に必要な個所にマスターミックスを 25μL 分注します。

(2) チップを取り替え BRAF MUT を 25μL 分注し、ピペットを使って最低2回混和してください。
(3) チップを取り替え BRAF WT を 25μL 分注し、ピペットを使って最低2回混和してください。
(4) チップを取り替え調製した DNA 検体を 25μL 分注し、ピペットを使って最低2回混和してください。
(5) コバス z 480 用 AD プレートにシールをした後、プレートを「コバス z 480」にセットして増幅・検出を開始します。マスターミックスと DNA 検体を混合後は1時間以内に測定を開始してください。
(6) 増幅・検出が終了したら、コバス z 480 用 AD プレートを「コバス z 480」から取り出します。
(7) 結果の Review 及び Accept は機器の取扱説明書に従って操作します。

## 【測定結果の判定法】

### 1. 測定結果の判定

#### (1) 判定法

コバス z 480 では検体及びコントロールの結果の判定を自動で行います。各コントロールが正しく測定され、測定が有効な場合、コントロール及び検体の判定結果は次のように表示されます。

コントロールの判定結果

| コントロール | 結果表示 |
|---|---|
| コバス BRAF V600 変異検出キット MUT コントロール | Valid |
| コバス BRAF V600 変異検出キット WT コントロール | Valid |

検体の判定結果

| 結果表示 | 結果の解釈 |
|---|---|
| Mutation Detected | 変異の存在あり※2 |
| Mutation Not Detected<br>又は<br>No Mutation Detected | 変異は検出されない※3 |
| Invalid | 測定無効<br>再検査が必要 |
| Failed | 測定中の機械的又はソフトに問題があった |

※2 変異のタイプは判定できません。
※3「Mutation Not Detected」又は「No Mutation Detected」の結果は、今回の測定では変異が検出されませんでしたが、変異遺伝子の割合や、検体の状態、阻害物質の存在又は DNA 量などに影響されるため、変異のなしを決定するものではありません。

#### (2) 測定の無効と再検

・どちらか片方のコントロールに“Invalid”の結果が得られた場合、その回の試験は無効となります。
・検体に“Failed”又は“Invalid”の結果が得られた場合、その検体測定は無効となります。その場合、フラグの確認方法や対処方法については機器の取扱説明書を参照してください。
・検体が“Invalid”の結果であった場合、抽出 DNA を用いて再測定を行ってください。その際、新しい測定用プレートと DNA SD、コントロールを使用してください。
・再測定の結果、再び“Invalid”の結果であった場合、新たに抽出 DNA 希釈液を作製します。新しいチューブを用意し、作製した抽出 DNA 希釈液 20μL と DNA SD 20μL を混和します。この希釈液を”抽出 DNA 希釈液”として再測定を行ってください。
・再測定を行っても”Invalid”を示す場合は組織試料より DNA を再抽出し、試験を繰り返してください。

### 2. 結果の判定にかかる注意

(1) PCR 反応を阻害する物質が含まれている検体では、偽陰性となる可能性がありますので注意してください。
(2) 臨床診断は、臨床症状やほかの検査結果などと併せて担当医師が総合的に判断してください。
(3) コントロールの結果が一貫して Invalid を示す場合は、弊社カスタマーセンターまでお問い合わせください。

## 【臨床的意義】

本品は、リアルタイム PCR 法を用いて BRAF 遺伝子のコドン 600 での変異を検出する体外診断用医薬品です。
本品は BRAF 阻害剤（ベムラフェニブ）による治療の適用を判断することを目的として用います。

**ベムラフェニブの治験成績概略（ベムラフェニブの承認時の治験成績より引用）**

### 1. 外国人における成績

**未治療の BRAF V600 変異を有する根治切除不能な III 期/IV 期の悪性黒色腫患者を対象とした第 III 相臨床試験（NO25026）**

化学療法歴のない BRAF V600 変異を有する根治切除不能な III 期/IV 期の悪性黒色腫患者 675 例を対象とし、ダカルバジン 1000 mg/m$^2$ を3週毎に投与※4する群とベムラフェニブ1回 960 mg を1日2回連日投与する群を比較した第 III 相非盲検ランダム化比較試験の成績（2010 年 12 月 30 日データカットオフ）を以下に示します。

全生存期間（OS）解析において、ダカルバジン投与群に対するベムラフェニブ投与群のハザード比は 0.37（95%信頼区間：0.26-0.55）であり、Kaplan-Meier 法で推定した中央値は、ダカルバジン投与群 7.75 ヵ月（95%信頼区間：6.28-10.28）、ベムラフェニブ投与群 9.23 ヵ月（95%信頼区間：8.05-未到達）と、統計学的に有意な OS の延長が確認されました（非層別 Log-rank 検定、p<0.0001）。
また、無増悪生存期間（PFS）解析において、ダカルバジン投与群に対するベムラフェニブ投与群のハザード比は 0.26（95%信頼区間：0.20-0.33）であり、Kaplan-Meier 法で推定した中央値はダカルバジン投与群 1.61 ヵ月（95%信頼区間：1.58-1.74）、ベムラフェニブ投与群 5.32 ヵ月（95%信頼区間：4.86-6.57）と、統計学的に有意な PFS の延長が確認されました（非層別 Log-rank 検定、p<0.0001）。
※4 承認された用法・用量及び減量・休薬規定外

### 2. 日本人における成績

**BRAF V600 変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫患者を対象とした第 I/II 相臨床試験（JO28178 試験）**

BRAF V600 変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫患者 11 例を対象とし、ベムラフェニブ1回 960 mg を1日2回空腹時（投与前2時間、投与後1時間絶食）に連日投与する第 I/II 相試験を実施しました。有効性評価の対象となった8例における奏効率※5は 75.0% (95%信頼区間：34.9-96.8）でした。
※5 RECIST (ver1.1) ガイドラインによる判定（CR+PR）

## **【性能】

### 1. 性能

【用法・用量（操作方法）】の記載に従い操作した時、以下の結果となります。
(1) 「コバス BRAF V600 変異検出キット MUT コントロール」を2重測定するとき、以下の結果となります。
変異型 BRAF 遺伝子検出用 DNA プローブより得られる Ct 値は 23.5～30.5 の範囲内です。
野生型 BRAF 遺伝子検出用 DNA プローブより得られる Ct 値は 23.5～29.0 の範囲内です。
(2) 「コバス BRAF V600 変異検出キット WT コントロール」を2重測定するとき、以下の結果となります。
変異型 BRAF 遺伝子検出用 DNA プローブより得られる Ct 値は NaN、または 43.0 より大きくなります。
野生型 BRAF 遺伝子検出用 DNA プローブより得られる Ct 値は 31.5～38.5 の範囲内です。
(3) 「約 4,000 c/mL に希釈したコバス BRAF V600 変異検出キット MUT コントロール」を 20 重測定するとき、19 回以上の測定が有効であり、なおかつ以下の結果となります。
19 回以上「変異陽性」の結果を得ます。
変異型 BRAF 遺伝子検出用 DNA プローブより得られる Ct 値はそれぞれ 21.0～43.0 の範囲内です。
野生型 BRAF 遺伝子検出用 DNA プローブより得られる Ct 値はそれぞれ 21.0～35.0 の範囲内です。

**管理用物質**

「コバス BRAF V600 変異検出キット MUT コントロール」は、BRAF V600E 変異陽性プラスミド DNA と野生型プラスミド DNA を用いて、変異 DNA が約 10%となるよう調製したものです。
「コバス BRAF V600 変異検出キット WT コントロール」は、BRAF 野生型 DNA 塩基配列含有プラスミド DNA を用いて調製したものです。

## 2. 最小検出感度

### (1) V600E

悪性黒色腫由来 FFPE 組織検体及び悪性黒色腫細胞株を用い検討を行ったところ以下のとおりの結果が得られました[1)]。

**FFPE 組織ブレンド検体**

| 検体 | 変異型の割合(%) | DNA 量 (ng/PCR) | 測定回数 | 期待される結果が得られた回数 | Hit Rate※6 |
|---|---|---|---|---|---|
| 10% FFPET Blend | 8.1 | 125 | 24 | 24 | 100% |
| | | 62.5 | 24 | 24 | 100% |
| | | 31.25 | 24 | 24 | 100% |
| 5% FFPET Blend 1 | 4.6 | 125 | 24 | 23 | 96% |
| | | 5 | 24 | 24 | 100% |
| | | 2.5 | 24 | 24 | 100% |
| | | 1.25 | 24 | 18 | 75% |
| | | 0.625 | 24 | 21 | 88% |
| | | 0.3125 | 24 | 17 | 71% |
| 5% FFPET Blend 2 | 5.1 | 125 | 24 | 24 | 100% |
| | | 5 | 24 | 22 | 92% |
| | | 2.5 | 24 | 24 | 100% |
| | | 1.25 | 24 | 23 | 96% |
| | | 0.625 | 24 | 14 | 58% |
| | | 0.3125 | 24 | 12 | 50% |
| 5% FFPET Blend 3 | 5.5 | 125 | 24 | 24 | 100% |
| | | 5 | 24 | 24 | 100% |
| | | 2.5 | 24 | 24 | 100% |
| | | 1.25 | 24 | 24 | 100% |
| | | 0.625 | 24 | 23 | 96% |
| | | 0.3125 | 24 | 17 | 71% |
| 2.5% FFPET Blend | 3.1 | 125 | 24 | 0 | 0% |
| | | 62.5 | 24 | 1 | 4% |
| | | 31.25 | 24 | 1 | 4% |
| 0% (100% WT) | 0 | 125 | 24 | 0 | 0% |

**FFPE 組織検体**

| 検体 | 変異型の割合(%) | DNA 量 (ng/PCR) | 測定回数 | 期待される結果が得られた回数 | Hit Rate※6 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 6.1 | 125 | 48 | 48 | 100% |
| | | 15.63 | 48 | 48 | 100% |
| | | 7.81 | 48 | 47 | 98% |
| | | 3.9 | 48 | 47 | 98% |
| | | 1.95 | 48 | 39 | 81% |
| | | 0.98 | 48 | 34 | 71% |
| 2 | 11.5 | 125 | 48 | 48 | 100% |
| | | 7.81 | 48 | 48 | 100% |
| | | 3.9 | 48 | 48 | 100% |
| | | 1.95 | 48 | 47 | 98% |
| | | 0.98 | 48 | 47 | 98% |
| | | 0.49 | 48 | 45 | 94% |
| 3 | 4.4 | 125 | 48 | 47 | 98% |
| | | 31.25 | 48 | 47 | 98% |
| | | 15.63 | 48 | 41 | 85% |
| | | 7.81 | 48 | 43 | 90% |
| | | 3.9 | 48 | 43 | 90% |
| | | 1.95 | 48 | 32 | 67% |

**悪性黒色腫細胞株**

| 検体 | 変異型の割合(%) | DNA 量 (ng/PCR) | 測定回数 | 期待される結果が得られた回数 | Hit Rate※6 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4.5 | 125 | 60 | 58 | 97% |
| | | 31.25 | 60 | 60 | 100% |
| | | 15.63 | 60 | 57 | 95% |
| | | 7.81 | 60 | 59 | 98% |
| | | 3.90 | 60 | 57 | 95% |
| | | 1.95 | 60 | 49 | 82% |
| | | 0.98 | 60 | 47 | 78% |
| | | 0.49 | 60 | 46 | 77% |

※6 Hit Rate(変異陽性と判定された測定数/有効測定数×100)

### (2) V600K 及び V600D(交差反応として)

悪性黒色腫由来 FFPE 組織検体及びプラスミド DNA を用い検討を行ったところ以下のとおりの結果が得られました[1)]。

**FFPE 組織**

| 検体 | 変異 | 変異型 DNA (%) | DNA 量 (ng/PCR) | 左記 DNA 量における Hit Rate※6 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | V600D | 17.7 | 15.62 | 100% |
| 2 | V600K | 21.5 | 125 | 0/3 |
| 3 | V600K | 16.5 | 125 | 0/3 |
| 4 | V600K | 22.71 | 125 | 0/3 |
| 5 | V600K | 31.4 | 3.90 | 100% |
| 6 | V600K | 34.6 | 3.90 | 100% |
| 7 | V600K | 39.26 | 3.90 | 100% |
| 8 | V600K | 36.07 | 1.95 | 100% |
| 9 | V600K | 61.67 | 3.90 | 100% |
| 10 | V600K | 68.75 | 0.49 | 100% |

**プラスミド DNA**

| 変異型／野生型 | V600D | V600K |
|---|---|---|
| 5%/ 95% | 0% | 0% |
| 10%/ 90% | 100% | – |
| 15%/ 85% | 100% | – |
| 20%/ 80% | 100% | – |
| 25%/ 75% | 100% | 0% |
| 30%/ 70% | 100% | 0% |
| 35%/ 65% | 100% | 100% |
| 40%/ 60% | 100% | 100% |
| 45%/ 55% | 100% | 100% |
| 50%/ 50% | 100% | 100% |
| 55%/ 45% | 100% | 100% |
| 60%/ 40% | 100% | 100% |
| 65%/ 35% | 100% | 100% |
| 70%/ 30% | 100% | 100% |
| 75%/ 25% | 100% | 100% |

## 3. 臨床試験

**海外臨床試験**

ベムラフェニブの海外第Ⅱ相試験及び第Ⅲ相試験にリクルートされた悪性黒色腫患者検体 433 検体を用い本法とダイレクトシークエンス法によるシークエンス解析との一致率を検討したところ良好な相関性を示しました[1)]。

| | ダイレクトシークエンス法 | | |
|---|---|---|---|
| 本法 | 変異陽性※7 | 変異陰性※8 | 合計 |
| 変異陽性 | 241 | 16 | 257 |
| 変異陰性 | 19 | 157 | 176 |
| 合計 | 260 | 173 | 433 |
| 陽性一致率 | 241/260×100=92.7% | | |
| 陰性一致率 | 157/173×100=90.8% | | |
| 全体一致率 | 398/433×100=91.9% | | |

※7 変異陽性:V600E、V600K、V600D 変異陽性

※8 変異陰性:野生型、または V600E、V600K、V600D 以外の V600 変異陽性

本法とダイレクトシークエンス法で結果が一致しなかった 35 検体についてパイロシークエンス法による確認試験を実施し、その結果を最終判定としたところ以下の結果が得られました。なお、結果が一致しなかった主な理由としては検出感度の差によるものと考えられます[1)]。

| | ダイレクトシークエンス法またはパイロシークエンス法※9 | | |
|---|---|---|---|
| 本品 | 変異陽性※10 | 変異陰性※11 | 合計 |
| 変異陽性 | 256 | 1 | 257 |
| 変異陰性 | 15 | 161 | 176 |
| 合計 | 271 | 162 | 433 |
| 陽性一致率 | 256/271×100=94.5% | | |
| 陰性一致率 | 161/162×100=99.4% | | |
| 全体一致率 | 417/433×100=96.3% | | |

※9 本品とダイレクトシークエンス法とでの結果が乖離したものについてはパイロシークエンス法の結果を対照法における結果として採用

※10変異陽性:V600E、V600K、V600D 変異陽性

※11変異陰性:野生型、または V600E、V600K、V600D 以外の V600 変異陽性

## 【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上（危険防止）の注意
   (1) 検体及び本品の取扱いには、使い捨て手袋、実験着などの保護衣及び保護用眼鏡を着用するなど、人体に直接触れないように注意してください。もし、このようなことが起きた場合は、大量の水でじゅうぶんに洗い流し、必要に応じて医師の診察を受けてください。また、測定終了後はよく手を洗ってください。
   (2) ピペットは口で吸わないでください。
   (3) 試薬が誤って目や口に入った場合には、直ちに水でじゅうぶんに洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。
   (4) 試薬が誤って皮膚及び粘膜に付着した場合には、直ちに多量の水で洗い流してください。
   (5) 試薬をこぼした場合には水で希釈してから拭き取ってください。
   (6) 抽出検体をこぼした場合は、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)などの消毒液を使用してじゅうぶんに拭き取ってください。なお、拭き取る際には、ゴム製の手袋などにより手を保護してください。
   (7) 検体及び本品を取り扱う場所では飲食又は喫煙をしないでください。
   (8) 検体は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って取り扱ってください。
   (9) 検体を取り扱う際に使用した器具類は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上加熱滅菌処理をするか、次亜塩素酸剤（有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%）に1時間以上浸すなどにより消毒してください。これらの作業中はじゅうぶんに換気を行ってください。
   (10) キシレンは危険な化学薬品です。定められた安全基準に準じてご使用ください。
2. 使用上の注意
   (1) 従来の測定方法から新しい測定方法に変更する場合は、変更前後の測定方法の相関性などを確認のうえ、ご使用ください。
   (2) 試薬及び消耗品は専用のものを使用し、その容器・付属品などはほかの目的に転用しないでください。
   (3) 試薬は必ず貯蔵方法に従って保存し、指定の条件以外で保存したものや使用期限を過ぎたものは使用しないでください。
   (4) ロットの異なる試薬又は残った試薬を混ぜ合わせて使用しないでください。
   (5) RXNMIX、MGAC 及び BRAF OM 以外の構成試薬は使用前に室温（15～30℃）に戻してから使用してください。また、使用後は再び2～8℃で保存してください。
   (6) すべての試薬は保存又は反応中に強い光を当てないでください。
   (7) すべての試薬は開封又は分注時に微生物の汚染を避けてください。
   (8) 増幅反応の準備は、紫外線照射装置の装備されたクリーンベンチ内で行ってください。ピペットなどは常にこのクリーンベンチ内に置いてください。増幅反応を準備するエリアには増幅後の DNA を持ち込まないでください。また、検体の分注には疎水性フィルター付き使い捨てチップを使用してください。
   (9) キャリーオーバーコンタミネーション防止のため増幅後の反応チューブの蓋をあけないでください。
   (10) 検査区域の分割やピペットの専用化及び次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)による器具、実験台の清掃などを徹底して行ってください。
   (11) 本キットを取り扱う際には微生物や核酸分解酵素のコンタミネーションを避けてください。汗や唾液に含まれる DNase が少量でも検体に混入しますと、DNA が分解され測定結果に誤りが生じる可能性があります。
3. 廃棄上の注意
   (1) 測定により生じた廃液については、検体などと同様に滅菌又は消毒の処理を行ってください。また、これらを廃棄する場合には、各都道府県によって定められた規定に従ってください。
   (2) 使用後の容器を廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物など区別して処理してください。
   (3) 遺伝子検査後の核酸試料及び増幅された DNA の廃棄は、次亜塩素酸剤を加えて有効塩素濃度が 5,000 ppm(0.5%)になるように混和後、一晩放置するなど、DNA を破壊してから廃棄してください。
   (4) DNA を扱ったピペットチップ及びプラスチック容器などは、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)に一晩浸すなどにより DNA を破壊してから、焼却処理又は密閉できるビニール袋を2重に施し、医療廃棄物として処理してください。
   (5) DNA を含む溶液は、次亜塩素酸剤を加えて有効塩素濃度が 5,000 ppm (0.5%) になるように混和後、一晩放置するなど、DNA を破壊してから、各都道府県によって定められた規定に従って廃液処理してください。
   (6) 全ての試薬には 0.1%未満のアジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムは鉛管、銅管と反応して爆発性のある金属アジドを生成することがあるため、廃棄の際には多量の水で洗い流してください。

## 【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法
   2～8℃で保存してください。
2. 有効期間
   16 ヵ月
   使用期限(Exp.)は外箱に記載してあります。

## 【包装単位】

コバス BRAF V600 変異検出キット 24テスト
（各構成試薬の詳細につきましては、【形状・構造等(キットの構成)】の項を参照してください）

## 【主要文献】

1) 自社データ

## 【問い合わせ先】

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
カスタマーサポートセンター
〒105-0014 東京都港区芝2-6-1
フリーダイヤル：0120-600-152

## 【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

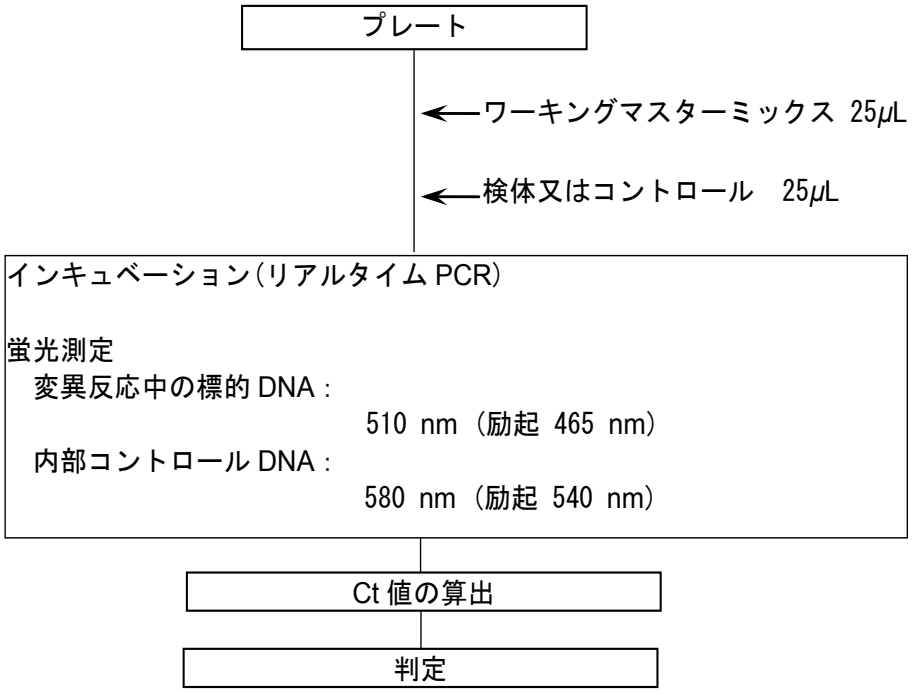
ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
〒105-0014 東京都港区芝2-6-1
フリーダイヤル：0120-600-152

## 《特許に関連するお知らせ》

本製品をご購入頂きましたお客様は、これら製品をヒトの体外診断目的におけるPCRによる核酸配列の増幅、検出及びその関連工程に使用することが許諾されています。この特定された使用許諾権以外には、いかなる種類の特許権又はライセンスも許諾されているものではありません。

COBAS is a trademark of Roche.
コバスは Roche の商標です。

＊《操作概略》


プレート
ワーキングマスターミックス 25μL
検体又はコントロール 25μL
インキュベーション(リアルタイム PCR)
蛍光測定
変異反応中の標的 DNA :
510 nm（励起 465 nm）
内部コントロール DNA :
580 nm（励起 540 nm）
Ct 値の算出
判定